



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE - PGDRA**

**ORGANOGENESE E REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE
FOLHAS DE *Piper tuberculatum***

GLAURA MUGRABE DE OLIVEIRA MAGALHÃES

Porto Velho-RO
2016



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE - PGDRA**

**ORGANOGENESE E REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE
FOLHAS DE *Piper tuberculatum***

GLAURA MUGRABE DE OLIVEIRA MAGALHÃES

Orientador: Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Qualificação de Mestrado apresentada
como requisito do Programa de Pós-
Graduação em Desenvolvimento Regional
e Meio Ambiente, Área de Concentração
em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade.

Porto Velho (RO)
2016

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA CENTRAL PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

M188o

Magalhães, Glaura Mugrabe de Oliveira

Organogênese e regeneração de plantas a partir de folhas de piper tuberculatum / Glaura Mugrabe de Oliveira Magalhães. Porto Velho, Rondônia, 2016.

55f. : il.

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR.

Orientador: Maurício Reginaldo Alves dos Santos

1. Calogênese 2. Brotções 3. Piperaceae I. Santos, Maurício Reginaldo Alves dos II. Título.

CDU:504:573

Bibliotecária Responsável: Ozelina Saldanha CRB11/486

GLAURA MUGRABE DE OLIVEIRA MAGALHÃES

**ORGANOGENESE E REGENERAÇÃO DE PLANTAS
A PARTIR DE FOLHAS DE *Piper tuberculatum***

Comissão Examinadora



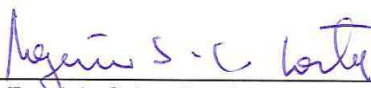
Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos
Orientador

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Dr. Vanderlei Maniesi
Membro Interno

Fundação Universidade Federal de Rondônia



Dr. Rogério Sebastião Correa da Costa
Membro Externo
Embrapa Rondônia

Dr. Artur de Souza Moret
Suplente

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, 13 de Setembro de 2016.

Resultado: _____

Dedico aos meus filhos Iago e Vitória Mugrabe

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus.

Aos meus pais, Glaber Camaz de Magalhães (*In Memoriam*) e Edna Mugarbe de Oliveira Lima que me ensinaram o caminho correto da vida e o legado dos estudos.

Aos meus filhos Iago e Vitória, pela compreensão, apoio e o incentivo. Sem vocês ao meu lado eu não conseguiria. Amo vocês!!!

Ao meu namorado Luciano Pinto pelo seu apoio, incentivo e o carinho que me foi concedido nas horas mais difíceis dessa etapa, muito obrigada!!

A toda minha família, meus irmãos, cunhados e sobrinhos que sempre acreditaram em mim.

Ao meu orientador Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, pela oportunidade e aprendizado que proporcionou durante a pesquisa. Seus ensinamentos foram enriquecedores. Obrigada!

As minhas companheiras de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Rondônia, Eloísa Santana Paz, Pricianny Souza, Carolina Barros, Carolina Augusto, Milene Guimarães e Wanessa Nogueira.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela oportunidade de estágio e pelo suporte físico e material no desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Fundação Universidade Federal de Rondônia.

Aos professores do PGDRA e colegas do Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, pelos ensinamentos e companheirismo.

A todos, que de maneira geral, contribuíram para elaboração desta pesquisa. Obrigada!

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”.

Dalai Lama

*“A leitura torna o homem completo;
A conversação torna-o ágil;
O escrever lhe dá precisão”.*

Francis Bacon

RESUMO

Dentre as espécies de Piperaceae se destaca *Piper tuberculatum*, planta nativa da Amazônia, utilizada na medicina popular devido às suas atividades sedativas, analgésicas, antiofídicas e digestivas. As plantas são ricas em metabólitos secundários bioativos, incluindo alcalóides, amidas, flavonóides e terpenos, possuindo assim importância econômica e medicinal. Tendo em vista a crescente demanda por produtos naturais bioativos, um método que permita a produção de mudas de *Piper tuberculatum* em um período de tempo reduzido e livre de doenças se torna promissor. Neste contexto a micropropagação surge como uma alternativa viável para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural ou quando os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis. O objetivo dessa pesquisa foi estabelecer um sistema para regeneração *in vitro* de plantas de *P. tuberculatum*. Foram utilizadas folhas de plantas *in vitro*, as quais foram inoculadas em meio Murashige & Skoog suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg L⁻¹), BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 10,0; 10,2 mg L⁻¹), ANA (0,0; 5,0 mg L⁻¹). Foram avaliadas as variáveis de média de indução de calos (IC), a média da área do explante coberto por células de calos (AECC) e o número de brotações por explante. Foi observada indução de calos entre 75 e 100% nos tratamentos com combinações de 2,0 mg L⁻¹ de BAP com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D; 3,0 mg L⁻¹ de BAP com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,2 mg L⁻¹ de BAP com 5,0 mg L⁻¹ de ANA. Em relação à área do explante coberta por células de calo, os tratamentos mais representativos foram 3,0 mg L⁻¹ de BAP com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D; 2,0 mg L⁻¹ de BAP com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,0 mg L⁻¹ de BAP com 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Os maiores números de brotações por explante foram observados com 4,0 mg L⁻¹ de BAP com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 4,0 mg L⁻¹ de BAP com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Para a regeneração de plantas de *P. tuberculatum* a partir de explantes foliares, recomenda-se o uso de 4,0 mg L⁻¹ de BAP com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Todas as plantas foram aclimatizadas com sucesso.

PALAVRAS-CHAVE: Calogênese, brotações, Piperaceae.

ABSTRACT

Among the species of Piperaceae stands *Piper tuberculatum*, plant native to the Amazon, used in folk medicine for its sedative, analgesic, antiophidian and digestive activities. The plants are rich in bioactive secondary metabolites, including alkaloids, amides, flavonoids and terpenes, thus having economic and medicinal importance. Given the growing demand for bioactive natural products, a method that allows the production of seedlings of *Piper tuberculatum* in a reduced period of time and free of diseases is promising. In this context micropropagation is a viable alternative for regenerating plants which have limitations in their natural reproduction or the conventional methods of vegetative propagation are not viable. The objective of this research was to establish a system for in vitro regeneration of *P. tuberculatum* plants. Leaves of in vitro plants were used, which were inoculated on Murashige & Skoog medium supplemented with different concentrations of 2,4-D (0.0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 mg L⁻¹), BAP (0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 10.0, 10.2 mg L⁻¹) e NAA (0.0, 5.0 mg L⁻¹). Averages of callus induction (CI), averages of the area of the explant covered by callus cells (AECC) and number of shoots per explant were evaluated. Callus induction was observed between 75 and 100% in treatments with 2.0 mg L⁻¹ BAP + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D; 3.0 mg L⁻¹ BAP + 4.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 10.2 mg L⁻¹ BAP + 5.0 mg L⁻¹ NAA. In relation to the area of the explant covered by callus cells, the most representative treatments were 3.0 mg L⁻¹ BAP + 4.0 mg L⁻¹ 2,4-D; 2.0 mg L⁻¹ BAP + 4.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 10.0 mg L⁻¹ BAP + 5.0 mg L⁻¹ 2,4-D. The highest number of shoots per explant was observed with 4.0 mg L⁻¹ BAP + 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 4.0 mg L⁻¹ BAP + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D. For *P. tuberculatum* plant regeneration from leaf explants, it is adequate to use 4.0 mg L⁻¹ BA and 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D. All the plants were successfully acclimatized.

KEY-WORDS: Callogenesis, shoots, Piperaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Piper tuberculatum</i> . (A) Aspecto geral. (B) Espigas. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2016.	17
Figura 2. Calos compactos de <i>P. tuberculatum</i> após 42 dias de inoculação. (A) 2,0 mg L ⁻¹ de BAP e 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D. (B) 3,0 mg L ⁻¹ de BAP e 4,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D.	30
Figura 3. Explantes de <i>P. tuberculatum</i> inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D e BAP. A- 7 dias, B- 14 dias, C- 21 dias, D-28 dias, E- 35 dias, F- 42 dias.	33
Figura 4. Organogênese indireta de explantes foliares de <i>P. tuberculatum</i> .	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias de indução de calos (IC) em explantes foliares de <i>P. tuberculatum</i> submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L ⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L ⁻¹), após 42 dias de cultivo.	29
Tabela 2. Médias de indução de calos (IC) em explantes foliares de <i>P. tuberculatum</i> submetidos a combinações de BAP (0,0; 0,2; 2,0; 10,0; 10,2 mg L ⁻¹), 2,4-D (0,0;0,2; 5,0 mg L ⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0; 5,0 mg L ⁻¹), após 42 dias de cultivo.	31
Tabela 3. Médias da área do explante coberta por células de calos (AECC) em explantes foliares de <i>P. tuberculatum</i> submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L ⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L ⁻¹), após 42 dias de cultivo.	32
Tabela 4. Médias da área do explante coberta por células de calos (AECC) em explantes foliares de <i>P. tuberculatum</i> submetidos a combinações de BAP (0,0; 0,2; 2,0; 10,0; 10,2 mg L ⁻¹), 2,4-D (0,0;0,2; 5,0 mg L ⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0; 5,0 mg L ⁻¹), após 42 dias de cultivo.	34
Tabela 5. Médias dos números de brotações em explantes foliares de <i>P. tuberculatum</i> submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L ⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L ⁻¹), após 42 dias de cultivo.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	Benzilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
GA ₃	Ácido giberélico
ANA	Ácido alfa-naftalenoacético
CIN	Cinetina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
MS	Murashige & Skoog
pH	Potencial de hidrogênio
mg L ⁻¹	Miligrama por litro
g L ⁻¹	Gramas por litro
mL	Mililitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1. OBJETIVOS.....	15
1.1 GERAL.....	15
1.2 ESPECÍFICOS.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 A FAMÍLIA <i>Piperaceae</i>	16
2.2 O GÊNERO <i>Piper</i>	16
2.3 A ESPÉCIE <i>Piper tuberculatum</i>	17
2.4 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	19
2.4.1 Micropropagação.....	20
2.4.2 Calogênese.....	21
2.4.3 Organogênese.....	22
2.4.4 Reguladores de crescimento.....	23
2.4.5 Aclimatização de plântulas regeneradas.....	24
3. CONTRIBUIÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 MATERIAL.....	27
4.2 CONDIÇÃO DE CULTURA.....	27
4.3 INDUÇÃO DE CALOS	27
4.4 REGENERAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 INDUÇÃO DE CALO.....	29
5.2 ÁREA DO EXPLANTE COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS.....	32
5.3 REGENERAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO.....	35
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICES.....	46

INTRODUÇÃO

O controle de pragas e doenças são os problemas que mais acometem a agricultura. A preocupação com os efeitos deletérios que o uso dos inseticidas pode causar na qualidade dos alimentos tem se tornado cada vez mais evidente. A utilização desenfreada de produtos químicos na produção agropecuária favoreceu o surgimento de pragas resistentes e de efeitos cumulativos sobre o meio ambiente. A utilização de novas técnicas de controle vem ganhando um papel cada vez mais importante. Estas técnicas incluem a utilização de extratos vegetais.

As pesquisas nesta área se concentram nas atividades biológicas dos metabólitos secundários das plantas. Estes metabólitos são as defesas bioquímicas das plantas e podem agir diretamente na defesa contra os herbívoros e contra infecção por microorganismos patogênicos, além de atrair polinizadores e dispersores de sementes.

Tais substâncias, em relação aos inseticidas sintéticos, têm apresentado uma alternativa segura e econômica para os agricultores, pois são facilmente biodegradáveis visto que são resultantes do metabolismo secundário das plantas. Algumas espécies têm se revelado bastante eficazes para uso como inseticida botânico, além de outros efeitos biológicos, como atividade bactericida e também fungicida. Estudos revelaram que dentre as plantas presentes na flora Amazônica com estes efeitos biológicos se encontram as da família Piperaceae, especialmente as espécies pertencentes ao gênero *Piper*.

Nesse contexto insere-se a espécie *Piper tuberculatum* Jacq., uma Piperaceae popularmente conhecida como pimenta de macaco, de grande interesse econômico por suas atividades inseticidas e à ação de suas piperamidas, em especial as isobutilamidas e piperidinas, bem como na medicina popular por suas atividades sedativas, analgésicas, antiofídicas e em problemas estomacais.

A propagação natural de *P. tuberculatum* pode ser feita via semente ou por estacas. Vale ressaltar que a quantidade de sementes por espigas é baixa, a germinação é lenta e irregular, enquanto a técnica da estaquia pode propagar doenças. Ambos os métodos são inconvenientes quando se trata de oferta e demanda. Sendo assim, um método de propagação *in vitro* pode desempenhar um papel importante na multiplicação rápida e na conservação de germoplasma.

A cultura de tecidos vegetais é uma das áreas da Biotecnologia que tem contribuído para o desenvolvimento sustentável na Amazônia. Além de empregar técnicas que se sobressaem às outras ao trabalhar com pequenas porções das espécies estudadas sem agressão à planta-mãe, favorece o pequeno produtor, pois as mudas provenientes de experimentos

biotecnológicos são livres de pragas e doenças e ainda há a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa e a diminuição do tempo necessário para o início da produção. Uma dessas técnicas é a micropropagação, a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto. É a metodologia que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas.

Com este trabalho buscou-se a determinação de um método para a micropropagação em larga escala de *P. tuberculatum*, o que permitirá a conservação da espécie e subsidiará futuros estudos relativos à produção *in vitro* de metabólitos secundários.

1. OBJETIVOS

1.1 GERAL

Estabelecer um sistema para regeneração *in vitro* de plantas de *P. tuberculatum*, subsidiando a conservação da espécie e a produção de princípios ativos de interesse agrônômico e pecuário.

1.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento na indução de calos em explantes foliares de *P. tuberculatum*.
2. Comparar o efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento na área do explante coberta por células de calos.
3. Avaliar o efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento na indução das brotações.
4. Promover a regeneração de plântulas a partir destas brotações e validar o método de propagação com a aclimatização das plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A FAMÍLIA Piperaceae

As piperáceas têm sido alvo de muitas pesquisas devido às características importantes que incluem a utilização na área alimentar, de fármacos, de cosméticos e perfumaria (SILVA & OLIVEIRA, 2000; LEMOS, 2003). A família Piperaceae é considerada uma das mais complexas e diversificadas entre as angiospermas. Essas espécies são consideradas primitivas e evolutivamente distintas, e é por isso que a definição do número de gêneros e composição de espécies, a sua filogenia e modelo da diversidade floral é atualmente objeto de grande controvérsia (JARAMILLO & MANOS, 2001). Para alguns autores, a família contém 14 gêneros e cerca de 1.950 espécies, amplamente distribuída em ambos os hemisférios e inclui plantas herbáceas, arbustos, trepadeiras e árvores (MABBERLEY, 1997). No Brasil, esta família está representada por 5 gêneros – *Ottonia* Spreng., *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Pothomorphe* Miq. e *Sarcochachis* Trel. - e um total de 479 espécies, sem especificar o número de espécies endêmicas (YUNCKER, 1972; BARROSO, 1978). Muitas espécies têm sido utilizadas na alimentação e na medicina popular para o tratamento de muitas patologias, como do trato respiratório (asma, bronquite e tosse), do aparelho digestivo (dores abdominais e diarreias), anti-inflamatório (reumatismo), antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e para o tratamento de feridas) e antileucêmica (LEAL, 2000). Em virtude destas inúmeras indicações terapêuticas, as piperáceas constituem-se numa estimulante fonte para a pesquisa fitoquímica e biológica (MOREIRA et al., 1995; BENEVIDES et al., 1999).

2.2 O GÊNERO *Piper*

O gênero *Piper* compreende cerca de 1.200 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais nos dois hemisférios. A maior diversidade, porém, está na região Neotropical, onde cerca de dois terços das espécies descritas são encontrados. Na região Amazônica é estimada a existência de cerca de 300 espécies (TAWAN et al., 2002).

Estudos realizados com plantas do gênero *Piper* nativas e cultivadas no estado de Rondônia têm demonstrado que são produtoras de óleos essenciais, amidas, flavonóides e fenilpropanoides, entre outros metabólitos secundários (FACUNDO et al., 2005).

Os constituintes químicos mais comuns são as amidas, em especial a isobutilamida, piperidina e pirrolidina. Também se encontram lignanas, neolignanas e seus precursores,

flavonóides, cavalactonas, butenólidos e epóxidos de ciclohexano (SENGUPTA & RAY, 1987).

A presença de amidas com atividade inseticida nas espécies de *Piper* tem conduzido a um estudo fitoquímico intenso desse gênero. A piperina foi a primeira amida a ser isolada dos frutos das espécies de *Piper* e os seus constituintes químicos têm sido frequentemente investigados, dentre os quais as amidas lipofílicas insaturadas. Essas, além de constituírem o principal grupo de metabólitos da planta, são os principais responsáveis pela atividade inseticida (PARMAR et al., 1997).

2.3 A ESPÉCIE *Piper tuberculatum* Jacq.

P. tuberculatum é um arbusto medindo aproximadamente de 2 a 2,5 m de altura, com folhas de bainha alada; pecíolo de 0,5 a 1 cm de comprimento; lâmina oblongo-elíptica ou ovadoelíptica, base assimétrica, ápice agudo, brilhante, glabra na face adaxial; nervuras ascendentes em número de 8 – 10 pares, peninérvias, dispostas até o ápice da lâmina. Espigas eretas, com 4 a 7 cm de comprimento; pedúnculo de 1 a 1,5 cm comprimento; bractéolas triangular-subpeltadas, marginalmente franjadas. Quatro estames; drupa tetragonal, lateralmente comprimida, glabra, com três estigmas sésseis (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004).

Figura 1. *Piper tuberculatum*. (A) Aspecto geral. (B) Espigas. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2016. Foto: MAGALHÃES, G.M.O.



Essa planta está distribuída pelo Continente Americano e Antilhas. No Brasil, ocorre naturalmente nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso. Cresce em altitudes próximas a 550 m, em encostas úmidas, em áreas de capoeira e em locais brejosos (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004).

Ao contrário de muitas espécies da família Piperaceae, a *P. tuberculatum* é uma planta ainda pouco estudada, sobretudo no Brasil, onde é popularmente conhecida na região nordeste como pimenta-de-macaco. No estado da Paraíba essa planta é usada como sedativo e como antídoto para picada de cobra, sendo conhecida localmente como pimenta d'arda (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 1997). Na Costa Rica essa espécie é abundante e semidomesticada, onde é usada como cerca viva (SCOTT et al., 2002).

A atividade inseticida dessa pimenta se deve, principalmente, à ação de suas piperamidas, em especial as isobutilamidas e piperidinas (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 1997; SCOTT et al., 2002). Foi constatada a atividade inseticida de extratos das folhas de *P. tuberculatum* sobre as larvas do mosquito *A. atropalpus*, o que revelou que os extratos da referida espécie são tão eficazes quanto o extrato das sementes de *P. nigrum*. Esses inseticidas alternativos, provenientes das folhas, se tornam uma fonte alternativa conveniente (SCOTT et al., 2002).

Pesquisas recentes demonstraram que diferentes extratos e compostos isolados a partir *P. tuberculatum* apresentaram atividade antifúngica (LAGO et al., 2004), antitumoral (BEZERRA et al., 2006), antiagregante plaquetária (FONTENELE et al., 2009), inseticida (POHLIT et al., 2004) e propriedades hipotensivas (DUARTE et al., 2004). Regassini et al. (2009) isolaram duas pirrolidinas alquilamidas das folhas de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*, piperilina e 4,5- dihidropiridina, que apresentaram elevada atividade contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

O óleo essencial das folhas de *P. tuberculatum* apresentou grande concentração de cariofileno e *alfa*-candinol (FACUNDO et al., 2005). O óleo essencial dos talos finos e dos frutos de *P. tuberculatum* apresentou em maior concentração óxido de cariofileno e cariofileno (FACUNDO et al., 2008). Do extrato etanólico dos frutos de *P. tuberculatum* foram isoladas as amidas diidropiplartina e piplartina, os esteróides *beta*-sitosterol e estigmasterol e o derivado do ácido cinâmico ácido 3, 4, 5-trimetoxi-cinâmico (FACUNDO et al., 2008). O ácido 3,4,5-trimetoxi-cinâmico apresentou atividade leishmanicida sobre *Leishmania amazonensis* (FERREIRA et al., 2010) e atividade antinociceptiva (RODRIGUES et al., 2009) e as amidas diidropiplartina e piplartina também apresentaram atividade

antinociceptiva (RODRIGUES et al., 2009). A fração diclorometano de *P. tuberculatum* e a amida piplartina apresentaram atividade protetora gástrica e esofágica (BURCI et al., 2013).

2.4 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

O termo cultura de tecidos vegetais é utilizado para definir a cultura asséptica *in vitro* de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas definidas. Essa técnica constitui uma importante ferramenta para estudos básicos, como a compreensão dos fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, diferenciação e morfogênese das células vegetais, bem como para estudos aplicados, como micropropagação, produção de compostos secundários, transformação genética, manutenção de germoplasma *in vitro* e limpeza clonal (SMITH, 2012).

A cultura de tecidos vegetais é uma das áreas da Biotecnologia, e compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório, vegetativamente e sob condições assépticas, também chamados de cultivo *in vitro*. A utilização destes métodos permite a produção de mudas com alta qualidade fitossanitária, durante todo o ano e em pequeno espaço físico, sob condições controladas. Também possibilita o armazenamento de material vegetativo, com o estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro*. As culturas *in vitro* não necessitam de irrigação, adubação, pulverização com defensivos agrícolas e outras práticas que podem ser danosas ao ambiente (SANTOS, 2008).

A cultura de tecidos vegetais consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (GIACOMETTI, 1990). Nessa técnica pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos, em um meio de cultura apropriado contendo reguladores de crescimento que contribuem para o desenvolvimento e multiplicação de células no explante, sendo, portanto, direta ou indiretamente, esta última via formação de calos (TORRES et al., 2000).

Na cultura de tecidos, são essenciais o controle e a prevenção da contaminação microbiana, pois o meio de cultura proporciona um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos, constituindo-se nas principais causas de perdas de material vegetal (PALÚ et al., 2011). O cultivo *in vitro* permite ainda aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura, etc.) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores,

que podem ser multiplicadas massivamente (ALVES et al., 2012). Nesse sentido, a cultura de tecidos dispõe alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse econômico (MORAIS et al., 2012).

2.4.1 Micropropagação

Atualmente, dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, destaca-se a micropropagação como a de maior interesse científico. Na área florestal enfatizam-se os esforços no intuito de tornar esta tecnologia acessível e economicamente viável. Porém, dificuldades são encontradas durante o processo, como a necessidade de desenvolvimento de protocolos otimizados para diferentes espécies ou grupos de clones e a recalcitrância das culturas na propagação *in vitro* de espécies lenhosas. Apesar dos avanços biotecnológicos relativos à propagação *in vitro* serem pouco expressivos se comparados com outras culturas de expressão agrícola, é reconhecido o grande potencial de impacto da utilização desta biotecnologia na silvicultura clonal e na indústria de base florestal (PENCHEL et al., 2007; XAVIER et al., 2009).

Os resultados efetivos obtidos com a propagação contínua de espécies do gênero *Piper* são poucos e têm se mostrado tecnicamente viáveis na clonagem de espécies recalcitrantes (ASSIS & MAFIA, 2007). Os estádios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos de fases que incluem a seleção do explante e obtenção de culturas livres de contaminantes, a multiplicação dos propágulos vegetativos, o enraizamento e a aclimatização na condição *ex vitro* das plantas obtidas *in vitro* (XAVIER et al., 2009).

São reconhecidos vários processos para a obtenção de plantas *in vitro* em larga escala, sendo que dentre estes destacam-se a organogênese e a embriogênese somática. Estes processos são também importantes nos programas de transformação genética, no sentido regenerar plantas a partir de tecidos transformados geneticamente uma vez que quanto mais eficiente, maior a possibilidade de se ter sucesso. O processo de micropropagação via organogênese *in vitro* é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre a fonte de explante, o meio de cultura e fatores do ambiente (XAVIER et al., 2009). Depende, ainda, da ação de reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas, como também da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo.

Apesar dos estudos em relação a esta técnica terem avançado muito nos últimos anos, ainda se faz necessária a adequação de protocolos de regeneração visando torná-la aplicável para os programas de propagação de piperáceas. A micropropagação, portanto, permite a

redução de tempo na obtenção de genótipos de piperáceas transformados geneticamente e pode ser economicamente viável na multiplicação, com impacto na conservação de material genético em condições de campo e *in vitro*.

2.4.2 Calogênese

O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000).

O calo é um tecido que se desenvolve em resposta a uma injúria, podendo esta ser física ou química. Células do calo são diferenciadas, embora desorganizadas, sendo que as células diferenciadas apresentam-se altamente vacuolizadas, com citoplasma fino e células muito grandes. Os principais fatores que influenciam a formação de calos são o tipo de explante, a composição do meio nutritivo e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura. Nessa fase, os melhores resultados são obtidos com o uso de tecidos jovens, cujas células possuem maior potencial de crescimento e divisão do que células adultas (TORRES et al., 1998). Para a obtenção dos calos é necessário determinar o meio de cultura adequado para a inoculação e manutenção destes tecidos. Por isso, condições para a formação de calos e de seu crescimento devem ser estudadas, sendo necessário o suplemento exógeno de reguladores de crescimento.

O balanço hormonal entre auxinas e citocininas é o aspecto mais importante para a cultura de calos (NOGUEIRA et al., 2007). Para ocorrer à indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Diversos fatores interferem na calogênese, tais com o tamanho do explante, composição do meio de cultura, reguladores vegetais, órgão fornecedor do explante, idade e época do ano em que o explante é colhido e genótipo da planta doadora. Calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogênicos *in vitro* (RODRIGUES & ALMEIDA, 2010). Alguns calos são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e são mais difíceis de manipular (FLORES, 2006).

Os calos são de grande importância para estudos morfogênicos *in vitro* e para o estabelecimento de suspensões de células para a obtenção de produtos secundários, incluindo

fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial (RODRIGUES & ALMEIDA, 2010).

Devido ao interesse pelas atividades medicinais e alimentícias, pela importância econômica e para a agroindústria promovida pela espécie *P. tuberculatum*, existe a necessidade de um aumento e melhora em sua produção, visando melhorar qualitativa e quantitativamente a produtividade de culturas. A técnica de cultura de tecidos pode ser uma alternativa viável, sendo possível com a utilização de fitorreguladores (VIEIRA & CASTRO, 2004).

2.4.3 Organogênese

A organogênese geralmente se dá pela otimização da relação citocinina/auxina no meio de cultura e ocorre pela diferenciação de órgãos e brotações diretamente do explante (organogênese direta) ou do calo (organogênese indireta) podendo originar-se de uma única célula ou de um conjunto de células. A organogênese caracteriza-se por ser uma estrutura monopolar e apresenta ampla conexão vascular dos órgãos formados com o explante (ANDRADE, 2006).

Segundo Brandão et al. (2005), a partir das células do calo surgem gemas adventícias capazes de desenvolver novas estruturas (parte aérea ou raiz), as quais podem ser utilizadas para a propagação de várias espécies. Para Alves et al. (2004), o processo de organogênese é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente, dependendo também da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais, durante o período de cultivo (SUGIYAMA, 1999). Muitos fatores, como a idade do explante, a utilização de reguladores de crescimento, antibióticos, e outros têm sido reportados como tendo influência na regeneração de plantas (YU & WEI, 2008).

Como desvantagem, a organogênese indireta, em que o explante passa pelo estágio de calo anteriormente à regeneração de plantas, pode gerar variantes somaclonais. Avanços estão sendo feitos para entender a ação dos reguladores de crescimento, principalmente em nível molecular, como sinalizadores de membranas e suas interações com os genes envolvidos no processo de morfogênese nas plantas (PALOMBI et al., 2007).

Protocolos têm sido estabelecidos para muitas espécies de piperáceas sendo que a maioria destes utiliza como explantes de segmentos nodais e internodais, pecíolos, raízes,

microestacas e segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*. Estudos de regeneração de plantas têm sido reportados para várias espécies de piperáceas: para *P. colubrinum* (KELKAR et al., 1996), *P. auritum* (DOMINGUEZ et al., 2006), *P. umbellatum* (SCHWERTNER et al., 2008), *P. methysticum* (ZHANG et al., 2008), *P. nigrum* (AHMAD et al., 2010; AHMAD et al., 2011), *P. crassinervum* e *P. aduncum* (DELGADO-PAREDES et al., 2012), *P. longum* (RANI & DANTU, 2012) e *P. aduncum* (SOUSA, 2013).

2.4.4 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são substâncias químicas sintéticas que possuem efeito sobre o metabolismo vegetal. Apresentam atividade fisiológica análoga à dos hormônios, são capazes de induzir o crescimento e o desenvolvimento das plantas quando aplicados exogenamente. Geralmente são adicionados ao meio de cultura para sanar as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; LAMAS, 2001). De acordo com França (2001), a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a biotecnologia atual.

Frank & Schmülling (1999) destacam a necessidade dos reguladores na obtenção de um padrão de crescimento dos calos, sendo as auxinas e as citocininas as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em cultura de tecidos vegetais.

As auxinas compreendem um grande grupo de substâncias que, em comum, possuem a capacidade de produzir aumento no volume e alongamento celular, ao mesmo tempo em que induzem a divisão celular. São as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

As principais auxinas, de uso freqüente em meios de cultura, segundo Krikorian (1991) são o ácido indol-butírico (AIA), o ácido naftaleno-acético (ANA), o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). O ANA é mais comumente utilizado na organogênese, enquanto o 2,4-D é usado na indução de calos e em culturas em suspensão (COSTA et al., 2008).

Segundo Souza & Abreu (2007), as auxinas, em particular o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) são extremamente importantes na indução da calogênese e células embriogênicas e na posterior remoção da auxina do meio de cultura. Estas células formam embriões somáticos. Além disso, o 2,4-D possui uma aplicação relevante no estudo da lignificação através de células em suspensão de várias espécies e com os mais variados objetivos.

De acordo com George et al. (2008b), as citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltipla. São de grande importância para a multiplicação da parte aérea e para a indução de gemas adventícias. Soares et al. (2011), afirmam que a concentração e o tipo de citocinina são os fatores que mais influenciam a multiplicação *in vitro*. A benzilaminopurina, conhecida como BAP, é a citocinina mais utilizada, seguida da cinetina (KIN), esta por sua vez estimula a divisão celular.

Conforme citação de George & Sherrington (1984), muitos aspectos da diferenciação e organogênese de tecidos cultivados *in vitro* estão relacionados com a interação entre a auxina e citocinina inclusas no meio de cultura. O balanço entre as duas categorias de reguladores de crescimento implica em diferentes efeitos.

As giberelinas formam outra classe de substâncias reguladoras do crescimento. Elas se caracterizam por serem compostos de ocorrência natural. Apenas dois ou três compostos ativos são disponíveis comercialmente. Aplicadas em plantas intactas, as giberelinas podem influenciar o crescimento, de diversas maneiras, aumentando o comprimento do caule, promovendo o florescimento e o aparecimento de frutos (DAMIÃO FILHO, 1995). Esse efeito pode ser explorado *in vitro*. Quando as partes aéreas produzidas não estão em condições de ser individualizadas para o enraizamento, devido ao seu tamanho, o cultivo na presença de GA₃ pode provocar alongamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

2.4.5 Aclimatização de plântulas regeneradas

Após a etapa de enraizamento *in vitro* as plântulas são aclimatizadas normalmente em ambiente com alta luminosidade e baixa umidade. A aclimatização envolve o transplante da plântula da condição *in vitro* para a casa de vegetação o que, geralmente, é uma fase crítica e que pode ser fator limitante para o processo de micropropagação de algumas espécies (TORRES et al., 1998).

Vários fatores estão envolvidos na morte ou sobrevivência das plântulas durante a aclimatização, tais como o genótipo, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, infecção por patógenos e o estresse pela alteração na radiação. O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta (DEBERGH & MAENE, 1981). A desordem estrutural e funcional nas plântulas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores do

meio de cultura. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas para condições *ex vitro* (ZIV, 1987).

Pasqual et al. (1997) afirmam que, durante o processo de transferência para a condição *ex vitro*, a cutícula é freqüentemente menos desenvolvida em razão da umidade relativa no interior dos frascos ser relativamente alta. Como consequência, ocorre elevada perda de água durante o processo de aclimatização. As modificações manifestadas, principalmente nas folhas, afetam os principais processos executados por elas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas. O ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta (DEBERGH & MAENE, 1984).

Dessa forma, a avaliação das mudanças estruturais que ocorrem em um tecido ou órgão formado em condições *in vitro* é de grande valia para se descobrir a real eficiência do processo organogenético e a funcionabilidade do novo órgão, tornando-se pré-requisito indispensável para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de plantas (SOARES, 2003).

3 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

A história do desenvolvimento econômico revela que as nações que alcançaram níveis satisfatórios de crescimento o fizeram à custa de perdas ambientais. Por isso, cresce a consciência mundial sobre a importância da preservação do meio ambiente, o que permite prever que esse será um dos temas que demandará definições e ações efetivas das instituições públicas, em especial, daquelas formuladoras de políticas econômicas e de ciência e tecnologia, fazendo surgir bases teóricas para um crescimento econômico com preservação ambiental (TAVARES et al., 2008).

O processo de desenvolvimento regional recente vem se prestando para acelerar o uso dos recursos bióticos e, ao mesmo tempo, tem pouca preocupação quanto à necessidade de conservá-los. São quatro as fases que caracterizam a evolução extrativista dos recursos vegetais da Amazônia: expansão; estabilização, onde há o equilíbrio entre oferta e demanda; declínio, causado pela redução dos recursos e, por fim, o plantio domesticado, que começa a se formar ainda na estabilização a partir de tecnologias e práticas comerciais que favoreçam as condições de plantio (BARBOSA, 2001).

No início da década de 1990, a EMBRAPA reconheceu que o desenvolvimento agrícola amazônico deve incluir extrativismo, manejo florestal e agroflorestal, além da agricultura convencional, tendo transformado todos seus centros na Amazônia em Centros de Pesquisa Agroflorestal. Para a EMBRAPA, os sistemas de produção são não convencionais, mais orientados para o pequeno proprietário e conservação da biodiversidade do que para os sistemas agrícolas convencionais (CLAY et al., 1999).

Na perspectiva de se conceber uma nova proposta de desenvolvimento rural, os aspectos da localidade, interagindo com as demais características da sustentabilidade e integração social e territorial, emergem como um dos seus aspectos fundamentais. A noção de desenvolvimento centrado essencialmente no local apresenta-se com uma conotação essencialmente integracionista, alusiva à superação das carências específicas das localidades; e, de uma integração das especificidades locais, no sentido da formação de sinergias territoriais (ARAGÃO & BORRERO, 2007). Assim, o conceito de local adquire a conotação de alvo sócio-territorial das ações; não sendo, no entanto, propriamente, um espaço micro, podendo ser tomado como um município ou, inclusive, como uma região compreendendo vários municípios (CORREIA, 2010).

Encontrar formas de garantir o desenvolvimento regional com a preservação do ambiente natural é um grande desafio para todos os setores, tanto para as universidades como para as empresas de pesquisa de ciência e tecnologia da região. Atualmente, a mobilização da sociedade, organizada em defesa do meio ambiente vem alterando as prioridades sócio-políticas e de ciência, tecnologia e inovação para os setores agropecuário e florestal (OLIVEIRA, 2011).

Nesse contexto, o estabelecimento de protocolos para a regeneração das espécies vegetais, tais como a *P. tuberculatum*, que enfrenta entraves na sua propagação convencional, integra um conjunto de práticas que visam ao desenvolvimento de tecnologias que propiciem a sustentabilidade no estado de Rondônia. Este estudo vai subsidiar trabalhos relacionados à conservação da espécie, bem como à identificação do potencial bioativo de metabólitos secundários da espécie, contribuindo para o estabelecimento de métodos alternativos de controle de pragas, tais como o carrapato (*Rhipicephalus microplus*) e a mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho.

4.1 MATERIAL

As sementes de *Piper tuberculatum* foram coletadas da casa de vegetação e levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho. A desinfestação ocorreu em câmara de fluxo laminar, onde foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e posteriormente em hipoclorito 2,0% (v/v) com Tween 20 por 20 minutos. Foram feitos 3 enxágues com água destilada e autoclavada.

Na sequência, as sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, sem adição de reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem (a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos). Estas sementes foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 1.000 lux, a 26±1°C.

4.2 CONDIÇÕES DE CULTURA

Após 90 dias e com aproximadamente 6,0 cm de altura, os explantes foram reduzidos a segmentos de 1,0 cm² em placas de Petri esterilizadas e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, sem adição de reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos.

4.3 INDUÇÃO DE CALOS

Para indução de calos, os explantes foliares foram transferidos para meio MS suplementado com diferentes combinações fatoriais de reguladores de crescimento: combinação de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg L⁻¹) com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), totalizando 25 tratamentos, e combinação de 2,4-D (0,2 e 5,0 mg L⁻¹), BAP (0,0; 0,2; 2,0;

10,0 e 10,2 mg L⁻¹) e ANA (0,5; 1,0 e 5,0 mg L⁻¹), totalizando 15 tratamentos, todos dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições cada, sendo cada repetição composta por três explantes.

A cada sete dias, durante 42 dias, os explantes foram avaliados de acordo com:

- a) média de indução de calos (IC);
- b) média da área do explante coberta por células de calo (AECC), utilizando o método de observação visual descrito por Mendonça, et al. (2013), que atribuem notas para a porcentagem de área coberta por células de calos: onde 0 = 0%, 1 = 25%, 2 = 50%, 3 = 75% e 4 = 100%; e
- c) número de brotações por explante.

4.4 REGENERAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO

Aos 60 dias de cultivo, as brotações foram excisadas e transplantadas, em câmara de fluxo laminar, para frascos de vidro contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, sem adição de reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem (a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos). Estes explantes foram mantidos em sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 1.000 lux, a 26±1°C. Durante o subcultivo foi avaliado o número total de brotações por explante.

Aos 120 dias após o subcultivo, as plântulas regeneradas *in vitro* foram levadas para fora do meio de cultura e as raízes foram cuidadosamente lavadas, delicadamente em água corrente para remover o ágar, e submetidas à aclimatização em casa de vegetação, em vasos de polipropileno, com sombreamento de 50% e irrigação por aspersão, três vezes ao dia, por períodos de 30 minutos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INDUÇÃO DE CALO

A formação de calos iniciou aos sete dias de cultura, com o intumescimento dos explantes. Com 42 dias, a formação de calos compactos foi observada com 100% de indução (Apêndice A), nas combinações com 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg L⁻¹ de BAP e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de indução de calos (IC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)				
	0	1	2	3	4
0	0,00 aB	0,00 Bb	0,00 bB	0,00 cB	2,00 aA
1	1,33 aA	1,67 abA	0,00 bA	1,00 bcA	1,33 aA
2	0,67 aB	2,67 aA	3,00 aA	2,00 abAB	2,33 aAB
3	0,00 aB	2,00 aA	2,33 aA	2,33 abA	2,67 aA
4	1,33 aA	2,33 aA	2,67 aA	3,00 aA	2,67 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma linha; médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

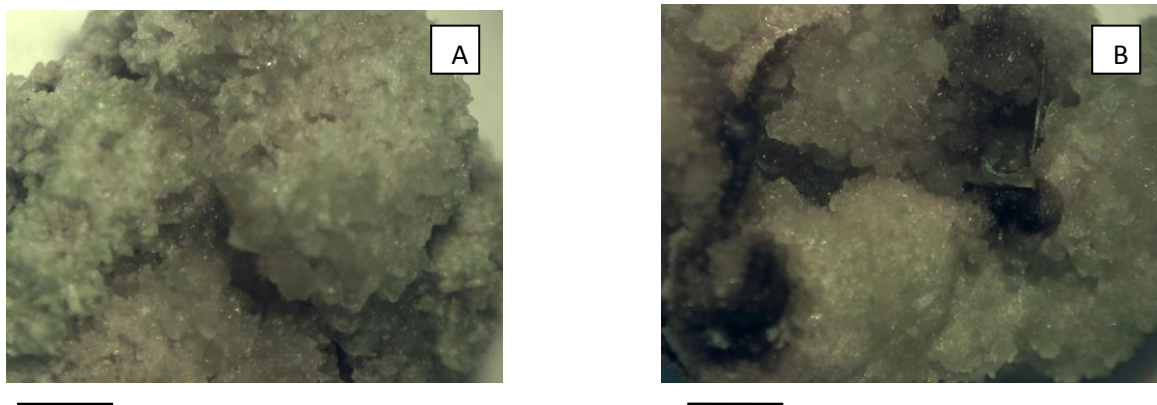
Santos et al. (2016) em pesquisa visando a produção de metabólitos secundários, obtiveram indução de calos em 100% dos explantes foliares de *P. permucronatum*, utilizando 1,0 mg L⁻¹ de BAP com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Dominguez et al. (2006), utilizando a concentração 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D obtiveram calos e regeneração a partir de explantes foliares de *P. auritum* Kunth. Em contrapartida aos experimentos de Paredes et al. (2012), que obtiveram regeneração de brotações e calos friáveis em explantes foliares e entrenodais de *P. aduncum*, com combinações de reguladores de crescimento (ANA, BAP e GA₃), mostrando um potencial morfogênico com resposta de 66,5% de calos.

Na Figura 2 estão apresentados os aspectos gerais dos explantes após 42 dias de cultivo. Pode-se observar o aspecto dos calos compactos e a coloração esverdeada. Segundo

George et al. (2008a), a textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, produz calos macios, friáveis e úmidos em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina, e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto seco e com células pequenas.

Figura 2. Calos compactos de *P. tuberculatum* após 42 dias de inoculação. (A) 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. (B) 3,0 mg L⁻¹ de BAP e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Barra: 1cm Foto: MAGALHÃES, G.M.O.



Neste experimento foi observado que os tratamentos com a ausência do 2,4-D não foram satisfatórios para a indução de calos em explantes foliares de *P. tuberculatum*. Segundo Taiz & Zeiger (2013), a formação de calos tem sido obtida de forma satisfatória através da auxina 2,4-D isoladamente, ou em combinação com a citocinina BAP. O 2,4-D é uma auxina sintética que implica no desenvolvimento do calo e as citocininas em conjunto com as auxinas, são propulsoras da divisão celular (FORKET et al., 2013).

Briskin et al. (2001) também avaliaram a formação de calos e brotações com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D em explantes foliares de *Piper methysticum*. Oliveira et al. (2006) observaram efeitos positivos de 2,4-D, isoladamente ou em associação com o BAP em *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Foram utilizados como fonte dos explantes eixo embrionário e cotilédones. Foi observada a formação de calos em 100% dos eixos embrionários no meio com a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. No tratamento que utilizou 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg L⁻¹ de BAP induziu a formação de 100% de calos nos eixos embrionários e nos cotilédones. Por outro lado, com a utilização do BAP isoladamente, observou-se que nenhum explante iniciou a formação de calos. Houve apenas a regeneração direta de ápices caulinares e/ou de raízes em 10% dos eixos embrionários. Este resultado indica que o BAP isoladamente não consegue induzir a formação de calos em *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Ahmad et al. (2011) em pesquisa com regeneração de pimenta preta, obtiveram 85% de indução de calo em explantes peciolares inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP após quatro semanas.

Santos et al. (2015) em pesquisa em explantes foliares de *P. carniconectivum*, em contrapartida com o presente estudo, observaram que os efeitos do 2,4-D e BAP foram individualmente significativos na indução de calos. O 2,4-D induziu calos em 77,62% dos explantes, enquanto que o BAP representou 73% na indução de calos.

Nos tratamentos com os reguladores 2,4-D, BAP e ANA, foi observado (Apêndice B) que o tratamento com a concentração de 5,0 mg L⁻¹ de ANA combinado com 10,2 mg L⁻¹ de BAP induziu calos em todos os explantes (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de indução de calos (IC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de BAP (0,0; 0,2; 2,0; 10,0; 10,2 mg L⁻¹), 2,4-D (0,0;0,2; 5,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0; 5,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	IC
-	-	-	0,00 d
-	-	0,2	0,00 d
-	-	5,0	0,00 d
-	0,5	-	0,00 d
-	1,0	-	0,00 d
0,2	-	0,2	0,00 d
0,2	-	5,0	0,00 d
0,2	0,5	-	0,00 d
0,2	1,0	-	0,00 d
2,0	-	0,2	0,00 d
2,0	-	5,0	1,11 c
2,0	0,5	-	0,00 d
2,0	1,0	-	1,22 bc
10,0	-	5,0	1,55 b
10,2	5,0	-	3,00 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Costa et al. (2008) verificaram que a adição da auxina ANA nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ possibilitou os maiores percentuais de formação de calos friáveis em explantes foliares de *Piper hispidinervum* C. DC. e o tipo de explante utilizado teve forte influência sobre esta variável. Nessas concentrações de ANA, a formação de calos observados com a utilização de segmentos foliares foi de 83,2% a 91,6%, valores significativamente superiores àqueles observados para os segmentos internodais, que foram de 43,1% e 49,6%.

Sousa (2013) obteve 88% de indução de calos em explantes foliares em *P. aduncum* utilizando 5,0 mg L⁻¹ de ANA com 2,5 mg L⁻¹ de BAP.

Trabalhos realizados com outras espécies também mostram a eficácia dos fitorreguladores ANA e BAP na indução de calos. Cerqueira (1999) obteve maior indução de calo em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* Linn.) utilizando 2,0 mg L⁻¹ de ANA combinado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP, obtendo 100% da área do explante coberta por calo.

Estudando a influência de diferentes combinações de auxina e citocinina sobre a formação de calos em explantes foliares de *P. hipidinerium*, Valle (2003) verificou efeito significativo da combinação de reguladores de crescimento utilizado. O cultivo desses explantes em meio contendo 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,2 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior formação de calos friáveis de coloração verde intensa. A interação destes reguladores corroboram os resultados obtidos nesta pesquisa com *P. tuberculatum*.

5.2 ÁREA DO EXPLANTE COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS

Em relação à área do explante coberta por células de calo (AECC), as maiores médias foram observadas nos tratamentos suplementados com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, como também no tratamento com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP (Apêndice C), onde todos os explantes apresentaram entre 75 e 100% da AECC (Tabela 3).

Tabela 3. Médias da área do explante coberta por células de calos (AECC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)				
	0	1	2	3	4
0	0,13 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,89 bcA
1	0,44 aA	0,56 aA	0,00 cA	0,56 bcA	0,56 cA
2	0,44 aB	1,44 aAB	2,78 abA	1,89 abAB	2,33 abA
3	0,00 aB	1,44 aAB	1,22 bcAB	1,78 bA	2,67 aA
4	0,44 aC	1,33 aBC	3,11 aA	3,44 aA	2,22 abAB

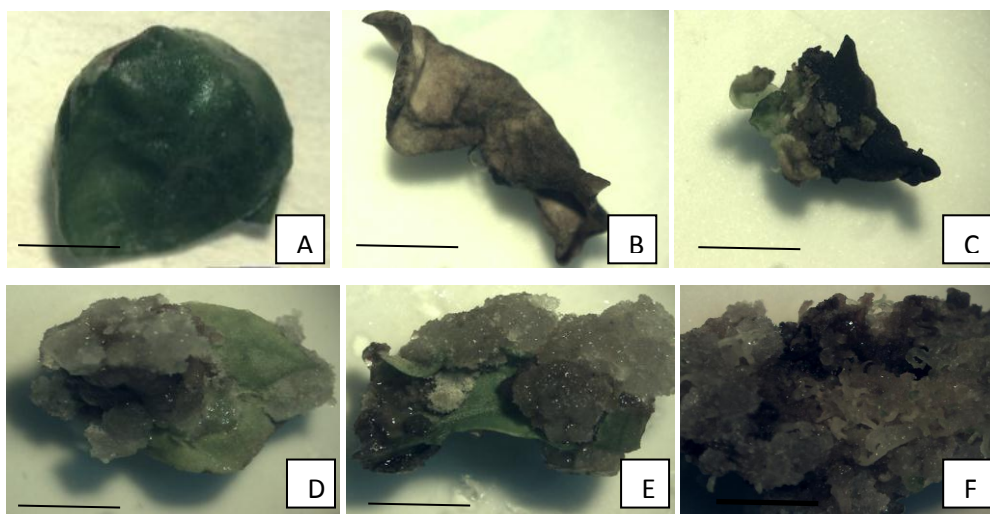
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma linha; médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com o método de observação visual descrito por Mendonça et al. (2013), que atribuem notas para a porcentagem de área coberta por células de calos: 0 = 0%, 1 = 25%, 2 = 50%, 3 = 75% e 4 = 100% (Figura 3), foi definida uma média das notas atribuídas para

cada tratamento. O tratamento com concentração de 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP obteve a média de 3,11, enquanto o tratamento com concentração de 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg L⁻¹ de BAP obteve a média 3,44. É possível observar uma faixa ótima de indução (100%), com a suplementação do meio de cultivo com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

A Figura 3 mostra o aspecto geral da formação de calos em segmentos foliares de *P. tuberculatum* meio MS suplementado com 2,4-D e BAP, após a inoculação até 42 dias de cultivo. No sétimo dia observou-se o intumescimento do explante (Figura 3A). Aos 14 dias observou a necrose de alguns explantes (Figura 3B). Aos 21 dias, a indução de calos no segmento foliar, representou mais de 25% da área do explante coberta por células de calos (Figura 3C). Aos 28 dias de cultivo, os calos permaneceram em 25% (Figura 3D). Com 35 dias de cultivo (Figura 3E) houve um aumento na proliferação chegando a 75% de calos no explante. Podemos observar aos 42 dias de cultivo um aumento de volume das células de calos em 100% (Figura 3F) cobrindo todo o explante.

Figura 3. Explantes de *P. tuberculatum* inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D e BAP. A- 7 dias, B- 14 dias, C- 21 dias, D- 28 dias, E- 35 dias, F- 42 dias. Barra: 1cm. Foto: MAGALHÃES, G.M.O.



Torres et al. (1998) citam que o regulador vegetal 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade. As auxinas são responsáveis pelo início da divisão e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular, sendo indispensáveis para a formação de calos afirmam Taiz & Zeiger (2009).

Nos tratamentos com combinações de BAP, 2,4-D e ANA, em relação à área do explante coberto por células de calo (AECC), as maiores médias foram observadas no tratamento suplementado com 10,0 mg L⁻¹ de BAP combinado com 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e no tratamento

suplementado com 10,2 mg L⁻¹ de BAP combinado com 5,0 mg L⁻¹ de ANA (Apêndice D) , onde todos os explantes apresentaram entre 75 e 100% da AECC (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da área do explante coberta por células de calos (AECC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de BAP (0,0; 0,2; 2,0; 10,0; 10,2 mg L⁻¹), 2,4-D (0,0; 0,2; 5,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0; 5,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	AECC*
-	-	-	0,00 d
-	-	0,2	0,00 d
-	-	5,0	0,00 d
-	0,5	-	0,00 d
-	1,0	-	0,00 d
0,2	-	0,2	0,00 d
0,2	-	5,0	0,00 d
0,2	0,5	-	0,00 d
0,2	1,0	-	0,00 d
2,0	-	0,2	0,00 d
2,0	-	5,0	0,67 c
2,0	0,5	-	0,00 d
2,0	1,0	-	0,89 b
10,0	-	5,0	1,00 ab
10,2	5,0	-	2,56 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Kelkar et al. (1996) obtiveram indução de calos para regeneração em explantes foliares de *P. colubrinum* utilizando os mesmos reguladores de crescimento BAP, 2,4-D e ANA. Constatou que o efeito de composição e reguladores de crescimento mais responsivo foi o de 2,0 mg L⁻¹ de BAP com 0,5 mg L⁻¹ de ANA, como também 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, com 100% de sobrevivência.

Estudando a influência de diferentes combinações de auxina e citocinina sobre a formação de calos em explantes foliares de *P. hipidinerum*, Valle (2003) verificou efeito significativo da combinação de reguladores de crescimento utilizada. O cultivo desses explantes em meio contendo 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,2 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a maior formação de calos friáveis de coloração verde intensa. Por outro lado, foi observado no presente trabalho que, nessa concentração de 10,2 mg L⁻¹ de BAP, os calos obtidos foram compactos e organogênicos.

A calogênese é considerada como uma característica significativa da organogênese indireta e para a pesquisa em moléculas biologicamente ativas em espécies medicinais (ABBASI et al., 2010).

5.3 REGENERAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO

Os tratamentos que utilizaram somente concentrações de BAP induziram calos compactos e brotação. A avaliação do número de brotações por explante foi feita visualmente durante o subcultivo. Os tratamentos sem a adição do regulador de crescimento BAP não induziu a brotação, porém os tratamentos com concentrações 4,0 mg L⁻¹ de BAP combinados com concentrações 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (Apêndice E) induziram maior número de brotações por explante (Tabela 5).

Tabela 5. Médias dos números de brotações dos calos em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)				
	0	1	2	3	4
0	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 cA
1	7,00 aB	2,00 bCD	0,00 bD	5,67 aBC	12,67 aA
2	0,00 bB	8,67 aA	9,33 aA	7,33 aA	6,33 bA
3	0,00 bB	9,33 aA	0,00 bB	9,67 aA	0,00 cB
4	7,00 aB	12,33 aA	12,33 aA	5,33 aB	4,00 bcB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma linha; médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultado semelhante foi observado em Erig et al. (2003), em pesquisa com a multiplicação *in vitro* da amoreira preta (*Rubus idaeus*), assim como Dzazio et al. (2002), estudando a micropropagação da porta-enxerto de videira 420-A, concluíram que a maior quantidade de brotações em cada explante foi notadamente observada nos meios com a presença da citocinina BAP.

Briskin et al. (2001), apresentaram resultados semelhantes no trabalho com *P. methysticum*, no qual foi verificado a calogênese e organogênese a partir de explantes foliares inoculados em meio MS acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Em contrapartida, Schwertner et al. (2008), obtiveram melhores resultados para o número médio de brotações a partir de explantes foliares de *P. umbellatum* (*Pothomorphe peltata* L.) inoculados em meio MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

Ahmad et al. (2011) descreveram em estudo com a pimenta preta a regeneração da parte aérea (92%) utilizando 0,5 mg L⁻¹ de BAP, após cinco semanas.

A regeneração de brotações ocorreu por meio da organogênese indireta (Figura 5), em contrapartida ao que foi descrito por Pereira et al. (2000) em segmentos de folhas de *P. umbellata*, onde ocorreu a organogênese direta.

Figura 4. Organogênese indireta de explantes foliares de *P. tuberculatum*. Barra: 1cm. Foto: MAGALHÃES, G.M.O.



Sousa (2013) verificou em seu trabalho de organogênese de *P. hispidinervum*, que o meio de cultura adicionado do regulador de crescimento BAP na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ obteve 2,9 brotações por explante e na concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ obteve 1,7 brotações por explantes. No mesmo estudo de regeneração com outra espécie, *P. aduncum*, constatou que o regulador BAP nas concentrações 0,01; 0,05 e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ foi eficaz no processo formação de multibrotações, auxiliando na obtenção de número elevado de mudas no processo de micropropagação.

A partir da inoculação das sementes até a indução das brotações transcorreram 150 dias (90 dias para a germinação e desenvolvimento das plântulas e 60 dias para a indução de brotos nos explantes foliares). As brotações permaneceram em sala de crescimento para enraizamento durante 120 dias. Em seguida, foram submetidas à aclimatização em casa de vegetação, com sombreamento de 50% e irrigação de 30 minutos por aspersão três vezes ao dia. Após 90 dias as plantas apresentaram 100% de sobrevivência.

CONCLUSÃO

Para a indução de calos recomenda-se a utilização dos tratamentos com combinações de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D; $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $10,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, os quais apresentaram entre 75 e 100% de indução nos explantes. Em relação à área do explante coberta por células de calo, os tratamentos mais representativos foram $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D; $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Os maiores números de brotações por explante foram observados com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Para a regeneração de plantas de *P. tuberculatum* a partir de explantes foliares, recomenda-se o uso de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Todas as plantas foram aclimatizadas com sucesso.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, B.H.; KHAN, M.A.; MAHMOOD, T.; AHMAD, M.; CHAUDHARY, M.F.; KHAN, M.A. Shoot regeneration and free-radical scavenging activity in *Silybum marianum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, p. 371-376, 2010.
- AHMAD, N.; FAZAL, H.; ABBASI, B.H.; RASHID, M.; MAHMOOD, T.; FÁTIMA, N. Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated tissues of *Piper nigrum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 129-134, 2010.
- AHMAD, N.; GUO, B.; FAZAL, H.; ABBASI, B.H.; LIU, C.Z.; MAHMOOD, T.; SHINWARI, Z.K. Feasible plant regeneration in black pepper from petiole explants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 4590-4595, 2011.
- ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese de explante foliar de clones de *eucalyptus grandis* x *e. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.
- ALVES, C.; OLIVEIRA, J.R.; REIS, E.S.; CORREA, R.M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C.O.; PAULA, J.C.R.; RODRIGUES, L.H.F.; SOUZA, M. A.; MENDONÇA, M.R. A Cultura de Tecidos na Agricultura. In: Jornada Científica 1., 2012, Bambuí-MG. **Anais...** BambuíMG: CEFET, 2012. 3p.
- ANDRADE, W.F.D.E. **Efeito de "pulse" na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado in vitro**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ARAGÃO, J.L.; BORRERO, M.A.V. Esboço de uma política pública de desenvolvimento sustentável para a pecuária leiteira da agricultura familiar de Rondônia em consonância com o sistema contemporâneo capitalista. In: BRASIL, V (org.). **Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente em Rondônia**. Porto Velho: Edufro, 2007, v. 1, p. 13-17.
- ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; DA-CUNHA, E.V.L.; CHAVES, M.C.O.C. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 559-561, 1997.
- ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Editora da UFV, 2007. p. 93-121.
- BARBOSA, F.B.C. A Biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 18, n. 2, p. 69-94, 2001.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: LTC/EDUSP, 1978. 255p.
- BENEVIDES, P.J.C; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 339-343, 1999.
- BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-

inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 6, p. 801-807, 2006.

BRANDÃO, R.L.; ABREU, M.C.; PETRILLO, C.P.; COELHO, G.T.C.P.; SCHARFFERT, R.E.; CARNEIRO, N.P.; CARNEIRO, A.A. **Regeneração em cultura de tecido de cultivares de sorghum bicolor através de Organogênese**. Sete Lagoas-MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 59p.

BRISKIN, D.; KOBAYASHI, H.; METHA, A.; GAWIENOWSKI, M.; AINSWORTH, L.; SMITH, M.A.L. Production of kavapyrones by Kava (*Piper methysticum*) tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 6, p. 556-561, 2001.

BURCI, L.M.; PEREIRA, I.T.; SILVA, L.M.; RODRIGUES, R.V.; FACUNDO, V.A.; MILITÃO, J.S.L.T.; SANTOS, A.R.S.; MARQUES, M.C.A.; HATSUKO, C.B.; WERNER, M.F.P. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 165-174, 2013.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E.; TORRES, A.C.; BUSO, J.A. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformações genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p. 87-132.

CERQUEIRA, E.S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal**. 1999. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CLAY, J.W.; SAMPAIO, P.T.B.; CLEMENT, C.R. Conservação e Desenvolvimento. In: ____ (Eds). **Biodiversidade Amazônica – exemplos e estratégias de utilização**. 1. ed. Manaus: INPA, 1999. v. 1, 409 p.

CORREIA, A.O. **Calogênese em ápices caulinares de *Bactris gasipaes* H.B.K.** 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2010.

COSTA, F.H.S.; LOUREIRO, T.S.; PEREIRA, J.E.S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.

DAMIÃO FILHO, C.F. **Cultura de Tecidos de Plantas**. Micropropagação. São Paulo/Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25p.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1981.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. **Parasitica**, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.

DELGADO-PAREDES, G.E.; KATO, M.J.; VÁSQUEZ-DUEÑAS, N.; MINCHLA-PATIÑO, J.; ROJAS-IDROGO, C. Cultivo de tejidos de *Piper* sp. (Piperaceae): propagación,

organogénesis y conservación de germoplasma *in vitro*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, n. 2, p. 49-60, 2012.

DOMINGUEZ, F.; LOZOYA, X.; SIMON, J. Tissue culture regeneration of a medicinal plant from Mexico: *Piper auritum* Kunth. **HortScience**, v. 41, n. 1, p. 207-209, 2006.

DUARTE, C.D.M.; VERLI, H.; ARAUJO-JUNIOR, J.X.D.; MEDEIROS, I.A.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. New optimized piperamide analogues with potent *in vivo* hypotensive properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 363-369, 2004.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6-Benzilanolpurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**. [online]. v. 32, n. 5, p. 765-770, 2003.

FACUNDO, V.A.; MORAES, S.M. Essential oil of *Piper tuberculatum* var. *tuberculatum* (Miq.) CDC leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 643-644, 2005.

FACUNDO, V.A.; POLLI, A.R.; RODRIGUES, R.V.; MILITÃO, J.S.L.T.; STABELLI, C.T.C. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, 2008.

FERREIRA, M.G.P.R.; KAYANO, A.M.; SILVA-JARDIM, I.; SILVA, T.O.; ZULIANI, J.; FACUNDO, V.A.; CALDERON, L.A.; SILVA, A.A.; CIANCAGLINI, P. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 1003-1006, 2010.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 168 f. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

FONTENELE, J.B.; LEAL, L.K.; SILVEIRA, E.R.; FELIX, F.H.; BEZERRA, C.F.; VIANA, G.S. 2009. Antiplatelet effects of pipartine, an alkalamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 511-515, 2009.

FORKET, D.E.; KIEBER, J.; HILL, C.C. Citocininas: Reguladores da Divisão celular. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 619-646.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; UFSC, 2001. p. 105-124.

FRANK, M.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin cycles cells. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 7, p. 243-244. 1999.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by Tissue Culture**. Basingstoke, England: Handbook and directory of commercial laboratories, 1984. 709p.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3.ed. Dordrecht: The Background, 2008a. 501p.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. Plant tissue culture procedure-Background. In: _____. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2.ed. Netherlands: Springer, 2008b. p. 1-28.

GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/EMBRAPA-CNPB, 1990. p. 19-25.

GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998. v. 1, p. 183-260.

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 706-716, 2001.

KELKAR, S.M.; DEBOO, G.B.; KRISHNAMYRTHY, K.V. *In vitro* plant regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 215-218, 1996.

KRIKORIAN, A.D. Propagación clonal *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MRROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 95-108.

LAGO, J.H.G.; RAMOS, C.S.; CASANOVA, D.C.C.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, D.C.B.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E.F.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.

LAMAS, F.M. Reguladores de Crescimento. In: Embrapa Agropecuária Oeste. **Algodão: Tecnologia de produção**. Dourados; Embrapa Agropecuária Oeste\ EMBRAPA - CNPA, 2001. p. 238-244.

LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; BUENO, J.S.S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 56-63, 2000.

LEAL, L.F. **Estudo químico e avaliação da atividade farmacológica e microbiológica de Piper mikanianum (Kunth) Steudel**. 2000. 158 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

LEMO, O.F. **Mutagenese e tecnologia in vitro no melhoramento genético da pimenta-do-reino (Piper nigrum L.)**. 2003. 159 f. Tese (Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MABBERLEY, D.J. **A Portable dictionary of the higher plants**. New York: The Plant Book, 1997. 706p.

MENDONÇA, E.G.; STEIN, V.C.; BALIEIRO, F.P.; LIMA, C.D.F.; SANTOS, B.R.; PAIVA, L.V. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrobacterial method. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 419-429, 2013.

MOK, M.C.; MARTIN, R.C.; MOK, D.W.S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, p. 102-107, 2000.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M. Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; GUIMARAES, E.F. Constituintes químicos de *Piper solmsianum* C.D.C. (PIPERACEAE). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 76, n. 4, p. 106-109, 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

OLIVEIRA, A.L.; KIDO, L.M.H.; KIDO, E.A.; ISEPPO, A.M.B. **Efeito de BAP e 2,4D na formação de Calos em Diferentes Explantes de Feijão-caupi**. Embrapa Meio-Norte, 12. 2006.

OLIVEIRA, C.L.L.G. **Vigor vegetativo de clones de café Conilon em condições de campo e seu potencial para propagação *in vitro***. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Rondônia, 2011.

PALOMBI, M.A.; LOMBARDO, B.; CABONI, E. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyrastrer* Burstd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 489-496, 2007.

PALÚ, E.G.; CORRÊA, L.S.; SUZUKI, A.N.; BOLIANI, A.C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PAREDES, G.E.D.; KATO, M.J.; DUEÑAS, N.V.; PATIÑO, J.M.; IDROGO, C.R. Cultivo de tejidos de *Piper* sp. (Piperaceae): propagación, organogénesis y conservación de germoplasma *in vitro*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, n. 2, p. 49-60, 2012.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 127p.

PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação *in vitro*. In: BORÉM (ed). **Biotechnology Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p. 75-92.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ARAÚJO, A.R.B.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; FRANÇA, S. Micropropagation of via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p. 47-53, 2000.

POHLIT, A.M. Screening of plants found in the state of Amazonas, Brasil for larvicidal against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 97-105, 2004.

RANI, D.; DANTU, P.K. Direct shoot regeneration from nodal, internodal and petiolar segments of *Piper longum* L. and *in vitro* conservation of indexed plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 9–17, 2012.

REGASINI, L.O.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G.D.; BOLZANI, V.S.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, 2009.

RODRIGUES, R.V.; LANZMASTER, D.; BALBINOT, D.T.L.; GADOTTI, V.M.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1809-1812, 2009.

RODRIGUES, F.R.; ALMEIDA, W.A.B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

SANTOS, M.R.A. Cultura de tecidos vegetais em Rondônia. Grupo Cultivar de Publicações. **Separata**, Biblioteca da Embrapa Rondônia, 2008.

SANTOS, M.R.A.; SOUZA, C.A.; GUIMARÃES, M.C.M.; SMOZINSKI, C.V.; MAGALHÃES, G.M.O.; NOGUEIRA, W.O.; PAZ, E.S. Growth pattern of friable callus from *P. Carniconnectivum* Leaf explants. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 27, n. 9, p. 226-231, 2015.

SANTOS, M.R.A.; GUIMARÃES, M.C.M.; PAZ, E.S.; MAGALHÃES, G.M.O.; SOUZA, C.A.; SMOZINSKI, C.V.; NOGUEIRA, W.O. Induction and growth pattern of callus from *Piper permucronatum* leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 142-146, 2016.

SCHWERTNER, A.B.S.; NAGAO, E.O.; HIDALGO, A.F.; ZAFFARI, G.R. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 76-81, 2008.

SCOTT, I.M.; PUNIANI, E.; DURST, D.; PHELPS, D.; MERALI, S.; ASSABGUI, R.A.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGENE, B.J.R.; ARNASON, J.T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, p. 137-144, 2002.

SENGUPTA, S.; RAY A.B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 58, n. 3, p. 147-166, 1987.

SILVA, A.C.P.R.; OLIVEIRA, M.N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 13p. (Boletim de Pesquisa, 23).

SMITH, R.H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. Texas, U.S.A: Academic Press, 2012. 208p.

SOARES, G.A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC) T. D. Penn.]**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. D.; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.

SOUSA, P.C.A. **Organogênese, embriogênese somática e o uso do óleo mineral como estratégias de propagação e conservação *in vitro* de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C. DC**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SOUZA, K.C.A.; ABREU, H.S. Biotecnologia aplicada ao estudo da lignificação. **Floresta e Ambiente**, v. 14, n. 1, p. 93-109, 2007.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61-64, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TAVARES, E.D.; SIQUEIRA, E.R.; SILVA, M.A.S. Agricultura e uso sustentável dos recursos naturais. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. (Eds). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa, 2008. p. 23-62.

TAWAN, C.S.; IPOR, I.B.; FASHIHUDDIN, B.A.; SANI, H. A brief account on the wild *Piper* (Piperaceae) of the Crocker Range, Sabah. **ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)**, v. 11, p 1-11, 2002.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa- SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 11-20.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BROGÍDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

VALLE, R.C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 74p.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009. 272p.

YU, Y.; WEI, Z. M. Influences of cefotaxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 553-556, 2008.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil: *Piper* – Group I, II, III and IV. **Hoehnea**, v. 2, p. 23-366, 1972.

ZHANG, Z.; ZHAO, L.; CHEN, X.; ZHENG, X. Successful micropropagation protocol of *Piper methysticum*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 110-112, 2008.

ZIV, M. *In vivo* hardening and acclimatization of tissue plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. (Eds.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1987. p. 187-196.

APÊNDICES

APÊNDICE A

EXPERIMENTO FATORIAL

Tabela com as médias de indução de calos (IC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

ANÁLISE DA INDUÇÃO DE CALOS

FV	GL	SQ	QM	F
2,4-D	4	40.74667	10.18667	19.1000 **
BAP	4	18.74667	4.68667	8.7875 **
Interação	16	24.18667	1.51167	2.8344 **
Tratamentos	24	83.68000	3.48667	6.5375 **
Resíduo	50	26.66667	0.53333	
Total	74	110.34667		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	50	3.7207	19.1	<.0001
4	50	3.7207	8.7875	0.001
16	50	2.3816	2.8344	0.0024
24	50	2.1844	6.5375	<.0001

Fator 1 = 2,4

Fator 2 = BAP

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

BAP x 2,4-D

BAP (mg L ⁻¹)					
2,4-D (mg L ⁻¹)	0	1	2	3	4
0	0.0000 aB	0.0000 bB	0.0000 bB	0.0000 cB	2.0000 aA
1	1.3333 aA	1.6667 abA	0.0000 bA	1.0000 bcA	1.3333 aA
2	0.6667 aB	2.6667 aA	3.0000 aA	2.0000 abAB	2.3333 aAB
3	0.0000 aB	2.0000 aA	2.3333 aA	2.3333 abA	2.6667 aA
4	1.3333 aA	2.3333 aA	2.6667 aA	3.0000 aA	2.6667 aA

dms para colunas = 1.6882 dms para linhas = 1.6882

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

$$MG = 1.57333$$

$$CV\% = 46.42$$

$$\text{Ponto médio} = 1.50000$$

APÊNDICE B

EXPERIMENTO EM BLOCOS CASUALIZADOS COM REPETIÇÕES

Tabela com as médias de indução de calos (IC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de BAP (0,0; 0,2; 2,0; 10,0; 10,2 mg L⁻¹), 2,4-D (0,0;0,2; 5,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0; 5,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

ANÁLISE DA INDUÇÃO DE CALOS

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	14	98.85926	7.06138	158.8810 **
Blocos	2	0.01481	0.00741	0.1667 ns
Trat x Bloc	28	2.65185	0.09471	2.1310 **
Resíduo	90	4.00000	0.04444	
Total	134	105.52593		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

BAP X ANA X 2,4-D

BAP(mg L ⁻¹)	ANA(mg L ⁻¹)	2,4-D(mg L ⁻¹)	IC
-	-	-	0,00 d
-	-	0,2	0,00 d
-	-	5,0	0,00 d
-	0,5	-	0,00 d
-	1,0	-	0,00 d
0,2	-	0,2	0,00 d
0,2	-	5,0	0,00 d
0,2	0,5	-	0,00 d
0,2	1,0	-	0,00 d
2,0	-	0,2	0,00 d
2,0	-	5,0	1,11 c
2,0	0,5	-	0,00 d
2,0	1,0	-	1,22 bc
10,0	-	5,0	1,55 b
10,2	5,0	-	3,00 a

dms para colunas = 0.6005 dms para linhas = 0.4106

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

$$MG = 0.45926$$

$$CV\% = 45.90$$

$$\text{Ponto médio} = 1.50000$$

APÊNDICE C

EXPERIMENTO FATORIAL

Tabela com as médias da área do explante coberta por células de calos (AECC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

ANÁLISE DA ÁREA DO EXPLANTE COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS

FV	GL	SQ	QM	F
2,4-D	4	42.12942	10.53236	22.3959 **
BAP	4	19.88942	4.97236	10.5731 **
Interação	16	21.96658	1.37291	2.9193 **
Tratamentos	24	83.98543	3.49939	7.4411 **
Resíduo	50	23.51407	0.47028	
Total	74	107.49950		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	50	3.7207	22.3959	<.0001
4	50	3.7207	10.5732	<.0001
16	50	2.3816	2.9193	0.0018
24	50	2.1844	7.4411	<.0001

Fator 1 = 2,4D

Fator 2 = BAP

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

BAP x 2,4-D

BAP (mg L ⁻¹)					
2,4-D (mg L ⁻¹)	0	1	2	3	4
0	0.1333 aA	0.0000 aA	0.0000 cA	0.0000 cA	0.8889 bcA
1	0.4444 aA	0.5556 aA	0.0000 cA	0.5556 bcA	0.5556 cA
2	0.4444 aB	1.4444 aAB	2.7778 abA	1.8889 abAB	2.3333 abA
3	0.0000 aB	1.4444 aAB	1.2222 bcAB	1.7778 bA	2.6667 aA
4	0.4444 aC	1.3333 aBC	3.1111 aA	3.4444 aA	2.2222 abAB

dms para colunas = 1.5853 dms para linhas = 1.5853

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

MG = 1.18756

CV% = 57.75

Ponto médio = 2.00000

APÊNDICE D

EXPERIMENTO FATORIAL

Tabela com as médias da área do explante coberta por células de calos (AECC) em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de BAP (0,0; 0,2; 2,0; 10,0; 10,2 mg L⁻¹), 2,4-D (0,0; 0,2; 5,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,5; 1,0; 5,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

ANÁLISE DA ÁREA DO EXPLANTE COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS

FV	GL	SQ	QM	F
2,4-D	3	14.04398	4.68133	28.4836 **
BAP/ANA	3	3.72917	1.24306	7.5634 **
Interação	9	4.52083	0.50231	3.0563 **
Tratamentos	15	22.29398	1.48627	9.0432 **
Resíduo	32	5.25926	0.16435	
Total	47	27.55324		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	4.4604	28.4836	<.0001
3	32	4.4604	7.5634	0.0005
9	32	3.0218	3.0563	0.0093
15	32	2.6556	9.0432	<.0001

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

BAP X ANA x 2,4-D

BAP(mg L ⁻¹)	ANA(mg L ⁻¹)	2,4-D(mg L ⁻¹)	AECC
-	-	-	0,00 d
-	-	0,2	0,00 d
-	-	5,0	0,00 d
-	0,5	-	0,00 d
-	1,0	-	0,00 d
0,2	-	0,2	0,00 d
0,2	-	5,0	0,00 d
0,2	0,5	-	0,00 d
0,2	1,0	-	0,00 d
2,0	-	0,2	0,00 d
2,0	-	5,0	0,67 c
2,0	0,5	-	0,00 d

2,0	1,0	-	0,89 b
10,0	-	5,0	1,00 ab
10,2	5,0	-	2,56 a

dms para colunas = 0.8959 dms para linhas = 0.8959

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

MG = 0.38194

CV% = 106.14

Ponto médio = 2.00000

APÊNDICE E

EXPERIMENTO FATORIAL

Tabela com as médias dos números de brotações dos calos em explantes foliares de *P. tuberculatum* submetidos a combinações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

ANÁLISE DA MÉDIA DE BROTAÇÕES

FV	GL	SQ	QM	F
2,4-D	4	575.81333	143.95333	39.6930 **
BAP	4	115.01333	28.75333	7.9283 **
Interação	16	849.52000	53.09500	14.6402 **
Tratamentos	24	1540.34667	64.18111	17.6970 **
Resíduo	50	181.33333	3.62667	
Total	74	1721.68000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	50	3.7207	39.693	<.0001
4	50	3.7207	7.9283	<.0001
16	50	2.3816	14.6402	<.0001
24	50	2.1844	17.697	<.0001

Fator 1 = 2,4-D

Fator 2 = BAP

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

BAP X 2,4- D

2,4-D (mg L ⁻¹)					
BAP (mg L ⁻¹)	0	1	2	3	4
0	0.0000 bA	0.0000 bA	0.0000 bA	0.0000 bA	0.0000 cA
1	7.0000 aB	2.0000 bCD	0.0000 bD	5.6667 aBC	12.6667 aA
2	0.0000 bB	8.6667 aA	9.3333 aA	7.3333 aA	6.3333 bA
3	0.0000 bB	9.3333 aA	0.0000 bB	9.6667 aA	0.0000 cB
4	7.0000 aB	12.3333 aA	12.3333 aA	5.3333 aB	4.0000 bcB

dms para colunas = 4.4024 dms para linhas = 4.4024
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

MG = 4.76000 CV% = 40.01
Ponto médio = 8.50000